

PCT/EP 03/11264



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

REC'D 17 NOV 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02023980.2

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 11/11/03
LA HAYE, LE

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 02023980.2

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 25/10/02

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
80686 München
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Biotechnologisch erzeugbares proteinhaltiges Präparat, Verfahren zu seiner Herstellung und seine
Verwendung als Lebensmittelzutat

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: DE
State:
Pays:

Tag: 16/10/02
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

DEA 10248263

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

A23J3/14, A23J3/16, A23L1/305, A23L1/03, A23G9/02, A23L1/23, A23C20/02, A23L1/20

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing:
Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT/BG/BE/CH/CY/CZ/DE/DK/EE/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25. Okt. 2002

Biotechnologisch erzeugbares proteinhaltiges Präparat, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung als Lebensmittelzutat

Die vorliegende Erfindung betrifft ein proteinhaltiges Präparat pflanzlichen Ursprungs mit deutlich verbesserten sensorischen und ggf. auch ernährungsphysiologischen sowie unvermindert guten technofunktionellen Eigenschaften, das durch Fermentation mit einem Milchsäurebakterium gewonnen werden kann. Dieses Präparat eignet sich als vielseitig verwendbare Lebensmittelzutat.

Proteine bzw. proteinhaltige Präparate werden als Zutaten für die Lebensmittel- und Futtermittelindustrie genutzt und finden vielfach Anwendung in der Formulierung von Lebensmitteln (Fleisch- und Wurstwaren, Backwaren, Feinkostprodukten, Getränken, Eiscreme und vielerlei mehr). Die große Bedeutung von Proteinprodukten liegt zunächst in der Versorgung von Menschen mit essentiellen Aminosäuren. Darüber hinaus bieten proteinhaltige Präparate einen mehrfachen Nutzen, da sie aufgrund ihrer technischen Eigenschaften ("Technofunktionalität") auch zur Verbesserung oder Kontrolle einer Vielzahl von Eigenschaften wie Wasser- oder Ölbindung, Schaumbildung, Texturierung, Dispergierbarkeit, Viskositätskontrolle oder Emulgierbarkeit oder dgl. eingesetzt werden können.

Je nach Art, Herstellungsweise und Herkunft verfügen proteinhaltige Präparate über unterschiedliche Eigenschaftsmerkmale hinsichtlich der technofunktionellen Wirkung in Rezepturen, aber auch hinsichtlich deren sensorischer Beeinflussung.

Häufig divergiert die Einsatzkonzentration pflanzlicher Proteinpräparate zu Gunsten von Proteinpräparaten tierischer Herkunft (Gelatine, Milchprotein, Milchpulver, Molkenpulver), weil pflanzliche Proteinpräparate über herkunftsbezogene Begleitsubstanzen verfügen, die vom ernährungsphysiologischen

Standpunkt aus unerwünscht sind und/oder den sensorischen und organoleptischen Eindruck der Rezeptur nachteilig beeinflussen. Proteinpräparate pflanzlichen Ursprungs sind nämlich in der Regel von Fehlparomen begleitet, die als "bohlig" beschrieben werden können und wahrscheinlich von Aldehyden wie Hexanal herrühren, und sie enthalten meist antinutritiv wirkende Substanzen wie Trypsininhibitoren und/oder unverdaubare Materialien wie z.B. α -1,6-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate, die Flatulenz verursachen können (siehe P. Scalabrini et al., Int. J. of Food Microbiology 39, 213-219 (1998)).

Es ist bekannt, dass der sensorische Eindruck und der Nährwert von Proteinpräparaten durch eine biotechnologische Behandlung dieser Präparate verändert und verbessert werden kann. So weiß man beispielsweise, dass sich der Anteil antinutritiv wirkender oder unverdaubarer Substanzen in Proteinpräparaten aus Sojabohnen durch Fermentation reduzieren lässt. Wie von H.L. Wang et al. in J. Milk Food Technol, 37 71 (1974) gefunden wurde, wächst *Lactobacillus acidophilus* in Sojamilch ohne Zusatz von Zucker. Die Lactobacillen setzen also die dort ausschließliche vorhandenen α -glykosidisch verknüpften Kohlenhydrate als alleinige Energiequelle um. Matteuzzi et al., Int. J. of Food Microbiol., 39 (1998), 213-219, und H.L. Wang (a.a.O.) konnten zeigen, dass Bifidobacteriumstämme unerwünschte Aromakomponenten, die aus dem oxidativen Abbau von ungesättigten Fettsäuren durch Lipxygenase-Aktivität gebildet werden, abbauen können. E.R. Buckner et al. beschreiben in Journal of Food Science, 44, 1534 (1979) die Fermentation von Erdnussmilch mit 19 verschiedenen Milchsäure-Bakterien unter Milchsäureproduktion. Von L.R. Beuchat et al., Journal of Food Science, 43, 1109 (1978) wurde festgestellt, dass die sensorischen Eigenschaften einer derart fermentierten Milch weniger unangenehm sind, so dass sie bei der Weiterverarbeitung in Gebäckwaren mit Buttermilch konkurrieren können. Allerdings

wurden die sensorischen Eigenschaften nur indirekt bewertet, da ausschließlich mit Fruchtaromen versetzte Gebäckstücke getestet wurden. L. Camacho et al. untersuchten in Int. J. of Food Microbiology 14, 277-286 (1991) die Fermentation eines

5 Lupinenbohnenextrakts mit verschiedenen Mikroorganismen der Gattung Lactobacillus und deren Auswirkung auf den Gehalt an Alkaloiden, Lactoflavin und einigen Aminosäuren und damit auf den ernährungsphysiologischen Wert der so erhaltenen Lupinenmilch. L. Ankenman Granata et al., J. of Food Science 61,
10 33 (1996) stellten fest, dass sich geschmackliche Leitsubstanzen wie Diacetyl in fermentierten Sojamilch-Produkten in vergleichbaren Konzentrationen finden lassen wie in einer Kontrolle aus (tierischer) Milch, wenn diesen Produkten Caseinat, Casein-Hydrolysat und Molkeprotein-Hydrolysat
15 zugegeben worden war.

Ausgangspunkt für die biotechnologische Behandlung von Proteinpräparaten aus geeigneten Pflanzen(teilen) ist in der Regel eine durch Extraktion der ganzen Pflanzen(teile), z.B. der
20 Saaten oder Bohnen, gewonnene "Milch". Dabei werden üblicherweise die Ausgangsmaterialien in Wasser gequollen, ggf. vorbehandelt, z.B. mit Natriumbicarbonat, ggf. blanchiert und/oder vermahlen und dann extrahiert. Die erhaltene Milch wird filtriert und dann pasteurisiert oder gekocht. Für Sojamilch
25 wird oft eine Variante des sogenannten Illinois-Prozesses angewandt (siehe z.B. A.I. Nelson et al., J. of Food Science 41 (1976), 57 oder K.M. Kamaly, Food Research Int., 30, (1997) 675-682. Ebenfalls beschrieben sind Produktionsbeispiele, die aus Lupinen- oder Sojamilch unter Zuhilfenahme von geeigneten
30 Milchsäurebakterien in biotechnologischen Verfahren ein joghurtähnliches Produkt erzeugen. Hierbei spielen neben den nutritiven und sensorischen vor allem die rheologischen Eigenschaften des biotechnologischen Erzeugnisses eine entscheidende Rolle (siehe R. Pinthong et al., J. Fd Technol. 15
35 (1980), 647-652). Die Sojamilch wird nach Pinthong, a.a.O., mit Milchsäurebakterien/Joghurtstarterkulturen (*Lactobacillus*

bulgaricus, *Streptococcus thermophilus*) fermentiert. Dabei entstehen in fermentierter Sojamilch Fehlgerüche, die auf die Lipoxygenase-Aktivität und die Freisetzung von Leitsubstanzen für Ranzigkeit zurückführbar sind. Y.J. Cheng et al. fanden
5 dagegen in Journal of Food Science, 55 (1990), 1178, dass ein Produkt, das durch Fermentation von Sojamilch bei Zusatz von Lactose und Milchproteinen und Joghurtstarterkulturen entsteht ("Sogurt"), rheologisch und sensorisch akzeptabel ist. Es ließe sich weitere Literatur anführen, in der teils die guten
10 technischen und sensorischen Eigenschaften der milchartigen Produkte gelobt, teils deren Fehlen bemängelt wird. Die Bewertung der Sensorik beruht dabei in der Regel auf subjektiven Tests.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein proteinhaltiges Präparat aus pflanzlichen Materialien bereitzustellen, das so verändert wurde, dass es zuverlässig positive Geschmacks- und Geruchseigenschaften aufweist, die ansonsten Milchprodukten zugeordnet werden, und dessen technische Eigenschaften wie
20 Emulgieraktivität, Gelbildung und Schaumbildungseigenschaften gegenüber denen des Ausgangsmaterials nicht oder nicht wesentlich verschlechtert sind.

Überraschend konnte gefunden werden, dass ein solches Präparat
25 erhältlich ist, wenn man pflanzliche Ausgangsmaterialien, deren Proteingehalt, bezogen auf die Trockensubstanz, bei mindestens 60 Gew.-%, vorzugsweise bei mindestens 70 Gew.-%, und noch stärker bevorzugt bei mindestens 80 Gew.-% und maximal bei 100 Gew.-%, bevorzugt bei 99 Gew.-% und stärker bevorzugt bei 90
30 bis 95 Gew.-% liegt, biotechnologisch behandelt, insbesondere wenn man sie mit Milchsäure produzierenden Mikroorganismen fermentiert.

Der Ausdruck "Proteingehalt", wie er in der vorliegenden
35 Anmeldung verwendet wird, ist definiert als der Gehalt, der sich

aus der Bestimmung des Stickstoff und dessen Multiplikation mit dem Faktor 6,25 errechnet.

Durch die biotechnologische Behandlung (Fermentation) der Ausgangsmaterialien entsteht Milchsäure, und deshalb enthält das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat Milchsäure. Je nach Art der eingesetzten Milchsäurebakterien handelt es sich dabei um D-Milchsäure, um L-Milchsäure oder um eine Mischung aus den beiden optischen Varianten. Bekanntlich ist die linksdrehende L-Milchsäure ernährungsphysiologisch besonders wertvoll, und deshalb ist es bevorzugt, dass ein großer Teil oder die gesamte Milchsäure als L-Milchsäure vorliegt. Wünschenswert ist es weiterhin, dass das erfindungsgemäße Proteinpräparat eine größere Menge an Milchsäure enthält, und zwar vorzugsweise mindestens ca. 5g/l und stärker bevorzugt mindestens ca. 8g/l. In besonders günstigen Fällen kann man sogar 10g/l Milchsäure oder noch mehr erhalten, wie unten näher dargelegt wird.

Weiterhin ist das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat gekennzeichnet durch ein milchproduktartiges Aroma. Das Aroma entsteht durch die Fermentation. Eine Leitsubstanz dieses Aromas ist Diacetyl, und in vielen Fällen ist ein hoher Diacetylgehalt wünschenswert, insbesondere, wenn das Proteinpräparat als Zutat für Lebensmittelzubereitungen eingesetzt werden soll, weil der Geschmack und Geruch in diesen Fällen trotz der Verdünnung durch weitere Bestandteile wahrnehmbar bleiben soll. Die Wahrnehmbarkeitsschwelle von Diacetyl liegt bei etwa 0,1 ppm, und der Gehalt an Diacetyl sollte in der Regel im erfindungsgemäßen Produkt nicht wesentlich unter 1 ppm liegen. Besonders bevorzugt sind ca. 10-20 ppm, und in manchen Fällen kann es gelingen, ihn noch weiter zu steigern.

Wie bereits voranstehend erwähnt, wird das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat aus einem pflanzlichen Ausgangsmaterial mit hohem Proteingehalt i.Tr. erhalten. Dieser Gehalt kann natürlicherweise vorhanden sein, oder aber das pflanzliche

Ausgangsmaterial wird vorbehandelt, um diesen Gehalt zu erzielen. Beispielsweise sind geeignete pflanzliche Ausgangsmaterialien proteinreiche Pflanzenextrakte, wie sie insbesondere aus Lupinen, Erdnüssen, Sojabohnen, Erbsen und anderen Leguminosen erhältlich sind. Gängig sind, wie aus dem oben beschriebenen Stand der Technik bekannt, wässrige Pflanzenextrakte, deren Trockensubstanz zu etwa einem Drittel aus Fett, einem Drittel aus Protein und einem Drittel aus Kohlenhydraten besteht. Die Erfindung geht im Gegensatz hierzu von deutlich höheren Proteinanteilen in der Trockensubstanz aus, und dies führt überraschenderweise zu dem Effekt, dass im fermentierten Produkt ein "bohliges" Fehl aroma objektiv entweder gar nicht oder nur in deutlich verringerter Menge vorhanden ist und im letzteren Fall durch die Aromen, die als "milchproduktartig" charakterisiert werden können, so stark überdeckt wird, dass es subjektiv nicht wahrgenommen wird.

Ebenfalls überraschend war der Befund, dass die technofunktionellen Eigenschaften des erfindungsgemäßen proteinhaltigen Präparates denen des jeweils gewählten Ausgangsmaterialien vergleichbar sind, d.h. trotz der Fermentation keine Verschlechterung dieser Eigenschaften zu beobachten ist. Dies gewährleistet gute Emulgier- und Schaumbildungseigenschaften, wie sie für viele Anwendungen benötigt werden.

Das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat ist in der Regel völlig oder im wesentlichen lactosefrei, da die Ausgangsmaterialien in der Regel lactosefrei sind. In den meisten Fällen wird auch kein Anlaß bestehen, ihm Lactose zuzusetzen, obwohl dies in spezifischen Fällen ohne weiteres möglich ist. Außerdem ist es in der Regel völlig oder im wesentlichen cholesterinfrei, weil die pflanzlichen Ausgangsmaterialien im Gegensatz zu entsprechenden tierischen Materialien in der Regel kein Cholesterin enthalten. Und natürlich ist es in der Regel frei von tierischem Protein oder

anderen tierischen Bestandteilen, es sei denn, diese werden aus speziellen Gründen zugesetzt.

Der Proteingehalt des erfindungsgemäßen Proteinpräparates ist gegenüber dem des eingesetzten Ausgangsmaterials im wesentlichen unverändert.

Je nach Wunsch kann das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat pasteurisiert oder anderweitig sterilisiert, also ein Präbioticum sein, oder es kann noch lebende Mikroorganismen enthalten, also ein biologisch aktives, probiotisches Lebensmittel oder eine solche Zutat für Lebensmittel sein. Ein probiotisches Lebensmittel wird vorzugsweise eingestellt auf einen Gehalt von 10^6 bis 10^{12} , stärker bevorzugt von etwa 10^8 bis 10^{10} und insbesondere von etwa 10^9 Mikroorganismen pro Gramm Lebensmittel, sofern dieser Gehalt nicht bereits gegeben ist.

Das Präparat kann als Proteinlösung oder Proteindispersion erhalten und anschließend entweder in flüssiger oder getrockneter Form (beispielsweise sprühgetrocknet oder in vergleichbarer Weise konvektiv getrocknet) eingesetzt werden. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass auch in getrockneten Produkten das milchproduktartige Aroma erhalten bleibt.

Das erfindungsgemäße proteinhaltige Präparat eignet sich beispielsweise als Lebensmittelzutat in

- joghurtartigen Produkten auf pflanzlicher Basis
- Joghurt
- milchartigen Drinks mit 0,1 - 3,5 % Fett auf pflanzlicher Basis
- aromatisierten Milchdrinks
- Eiscreme mit milchproduktartigem Aroma
- lactosefreier Eiscreme mit milchproduktartigem Aroma

- Dessertspeisen
- Reisprodukten (lactosefrei) mit
milchproduktartigem Aroma
- Backmitteln
- feinen Backwaren

Die Herstellung des erfindungsgemäßen proteinhaltigen Präparats beginnt mit der Rohstoffvorbereitung. In der Regel wird man von Leguminosen als pflanzlichen Ausgangsmaterialien ausgehen, weil diese in großem Umfang angebaut werden und sich aufgrund eines akzeptablen Proteingehaltes eignen. Es sollte aber klar sein, dass die Erfindung nicht auf Proteinpräparate aus Leguminosen beschränkt ist.

Wie bereits erwähnt, wird bei Bedarf der Trockenmassen-Gehalt an Protein erhöht, wenn dieser im Rohmaterial nicht ausreichend hoch ist. So kann beispielsweise bei der Rohstoffvorbereitung eine Entölung (z.B. mit einem lipophilen Lösungsmittel wie Hexan oder mit CO₂) stattfinden. Außerdem können bei Bedarf Kohlenhydrate abgetrennt werden. Weitere Schritte, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind, können natürlich ebenfalls vorgesehen sein, so z.B. ggf. eine Entbitterung der Ausgangsmaterialien oder dergleichen. Ein günstiges Ausgangsmaterial ist beispielsweise dasjenige, das man durch Behandlung von Lupinensamen gemäß EP 1 024 706 B1 erhält. Lupinensamen enthalten natürlicherweise etwa 38-50% der Trockenmasse Protein und damit etwas mehr als z.B. Soja oder gar Raps. Mit dem in der genannten EP-Patentschrift beschriebenen Behandlungsverfahren kann man sehr reine Proteinisolate erhalten. Solche sehr reinen Materialien, auch aus anderen pflanzlichen Proteinquellen, sind erfindungsgemäß sehr gut geeignet; es sollte aber klar sein, dass ein derart hoher Reinheitsgrad an Protein für die vorliegende Erfindung zwar besonders günstig, aber nicht Voraussetzung ist. Es kann beispielsweise genügen, die eingesetzten Pflanzenteile zu entölen und ggf. von enzymatischer Aktivität zu befreien, die

einen negativen Einfluß haben könnte, und/oder zu entbittern. Ob das pflanzliche Ausgangsmaterial für die Fermentierung eine kleinere Menge an Mono-, Oligo- und/oder Polysacchariden enthalten soll oder nicht, wird der Fachmann in Anbetracht des angestrebten Verwendungszwecks entscheiden.

Das Rohmaterial wird bei der Rohstoffvorbereitung in eine für die Fermentation geeignete Form überführt, z.B. in eine wässrige Suspension oder Lösung. Der Fachmann kennt die hierfür notwendigen verfahrenstechnischen Schritte wie Zerkleinerung des Pflanzen-Ausgangsmaterials, Extraktion, Trennung von Proteinextrakt und Faserfraktion, Proteinfällung, Trocknung und dergleichen und wird sie im benötigten Umfang anwenden, z.B. im Rückgriff auf die oben erwähnte EP 1 024 706 B1.

Je nach Zusammensetzung der zu fermentierenden Suspension oder Lösung müssen oder können dieser bei Bedarf oder Wunsch Zusätze beigegeben werden. So ist darauf zu achten, dass eine ausreichende Menge an Zucker (z.B. Glucose) vorhanden ist, der den fermentierenden Mikroorganismen als Nährstoffquelle dient, und dieser muss oder kann ggf. zugesetzt werden, oder es müssen oder können Zusätze beigegeben werden, die während der Fermentation solche Zucker aus vorhandenen Kohlenhydraten freisetzen. Weiterhin muss den Mikroorganismen eine geeignete Stickstoffquelle zur Verfügung stehen. Wenn die zu fermentierende Suspension oder Lösung diese nicht in ausreichendem Maße bieten kann, beispielsweise durch vorhandene Aminosäuren, müssen entsprechende stickstoffhaltige Verbindungen oder Zusätze, die solche Verbindungen aus dem vorhandenen Material freisetzen, zugesetzt werden, wie im Stand der Technik bekannt. Als Stickstoffquelle eignet sich beispielsweise ein Hefeextrakt. Gleiches gilt für die Mineralsalze, deren Anwesenheit für die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen erforderlich ist. Auch sie können ggf. zugesetzt werden.

Die Fermentation wird in an sich bekannter Weise mit Hilfe von Milchsäure produzierenden Mikroorganismen durchgeführt. Die Fermentation kann anaerob oder in Gegenwart von Sauerstoff, homofermentativ oder heterofermentativ erfolgen. Demzufolge gibt es in der Auswahl der Bakterien prinzipiell keine Beschränkung, sofern sie Milchsäure und Diacetyl produzieren können und nicht toxisch sind. So können Lactococcen wie *Lactococcus lactis* oder Lactobacillen wie *Lactobacillus casei* eingesetzt werden, die beide L-Milchsäure produzieren, oder andere Bakterien wie *Pediococcus damnosus*, bei deren Einsatz man ein Milchsäure-Racemat erhält. Besonders günstig ist es, solche Bakterien für die Fermentation einzusetzen, die entweder reine L-Milchsäure erzeugen und/oder die in der Lage sind, schnell eine große Menge an Milchsäure zu produzieren. Es hat sich herausgestellt, dass unter diesem Aspekt insbesondere Lactobacillen der Stämme *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus paracasei* oder *Lactobacillus plantarum* geeignet sind. *Lactobacillus perolens* ist ein 1985 von Back aus Limonade isolierter Mikroorganismus, u.a. hinterlegt bei der DSMZ in Braunschweig, Deutschland unter der Nr. 12744. Der Organismus wurde von Prof. Dr. Werner Back am 23. Oktober 2002 bei der DSMZ unter der Nr. DSM 15255 nach Budapester Vertrag hinterlegt. Die anderen Mikroorganismen, *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus plantarum*, sind seit langem bekannt und können käuflich erworben werden, z.B. bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSZM) in Braunschweig, Deutschland. Beispiele für dort hinterlegte Stämme sind z.B. DSZM 5622, 2649, 5457, 8741, 8742, 20006, 20020, 20207, 20244, 20312 oder 46331.

Für die Herstellung des Fermentationsmediums kann man übliche Methoden anwenden. So können die Zutaten mit Ausnahme von Glucose gemischt und ggf. mit Wasser verdünnt werden, z.B. durch Einbringen der Mischung in Wasser, das bereits im Fermenter vorgelegt wurde. Um das Wachstum fremder Mikroorganismen zu verhindern, sind geeignete Maßnahmen zu treffen, beispielsweise

eine Pasteurisierung oder Tyndallisation des Fermentationsmediums. In geeigneter Weise kann dann dem Nährmedium nach dem Erhitzungsschritt eine für den gewählten Organismus verwertbare Kohlenstoffquelle wie z.B. Glucose zugesetzt werden. Damit werden Bräunungsreaktionen im Fermentationsmedium verhindert. Anschließend wird der Fermenter mit dem Inokulum des entsprechend gewählten Mikroorganismus beimpft. Geeignet ist beispielsweise eine etwa 1 %ige Bakteriensuspension. Alternativ können die Mikroorganismen natürlich auch auf einem stationären Substrat immobilisiert eingesetzt werden. Die Fermentation kann batchweise oder kontinuierlich erfolgen; dem Fachmann sind die geeigneten Maßnahmen hierfür bekannt, sie weichen vom Üblichen nicht ab. Die Fermentation erfolgt bei einer für das gewählte Bakterium geeigneten Temperatur. Der Kontakt mit dem Fermentationsmedium kann einige Stunden, ggf. auch einige Tage lang andauern, je nachdem wie schnell der Mikroorganismus Milchsäure produziert. Der absinkende pH-Wert kann ggf. abgepuffert werden, um das Medium möglichst lange in einem pH-Wert-Bereich zu halten, in dem weitere Milchsäure produziert wird. Mit dieser Maßnahme kann die Milchsäureproduktion auf deutlich über 10g/l gesteigert werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird dem Fermentationsmedium Fruchtsäure, vorzugsweise Citronensäure zugesetzt. Dadurch kann die Menge an Diacetyl gesteigert werden. Die Erfinder haben bei dieser Beeinflussung der Fermentation insbesondere im Fall von Citronensäure eine lineare Korrelation zwischen der Menge an zugesetzter Fruchtsäure und gebildetem Diacetyl feststellen können. Eine Menge von ca. 2g/l Citronensäure hat sich als günstig erwiesen. Der Fermentationsverlauf wird hierdurch nicht negativ beeinflusst.

Als Endprodukt erhält man eine Lösung oder eine Suspension, die je nach eingesetzter Konzentration der Lösung oder Suspension des Rohmaterials in der Regel etwa 5 bis 25% Trockenmasse,

vorzugsweise etwa 15 bis 20% Trockenmasse besitzt. Der Diacetylgehalt liegt in der Regel bei etwa 9 bis 21 ppm. Antinutritiv wirkende α -glycosidisch verknüpfte Kohlenhydrate sind meist nicht oder nahezu nicht vorhanden.

5

Technologisch wichtige Parameter des erfindungsgemäßen Proteinpräparats können leicht in geeigneter Weise eingestellt werden. So konnte in einer 1 %igen Lösung des erfindungsgemäßen Proteinpräparates (ca 85 % Protein TS; Ausgangsmaterial ca. 95 % Protein TS), hergestellt nach dem voranstehend beschriebenen Verfahren, eine Emulgierfähigkeit (Emulgierkapazität) bei pH 7. im Bereich von 400 bis über 500 ml Öl/g Protein und in einer 10% igen Lösung eine Emulgieraktivität von 40-50% beobachtet werden, wobei die Kontrollgruppe (identisches Ausgangsmaterial, nicht fermentiert) unter denselben Bedingungen 500 ml Öl/g Protein emulgieren konnte. Die Testbedingungen für die Emulgierfähigkeit (Emulgierkapazität) sehen vor: 1) Herstellen der Proteindispersion/Lösung, 2) kontinuierliche Zugabe von pflanzlichem Öl unter Rühren und Emulgieren der Mischung (O/W) mit Laborreaktor (IKA LR-A1000 mit UltraTurrax T25 bei 11000 UpM.) und Bewerten des maximalen Volumens an Öl in ml bis zur Phaseninversion (=Emulgierkapazität). Handelsübliches Milcheiweiß (Na-Caseinat) besitzt unter vergleichbaren Testbedingungen eine Emulgierkapazität von 800-900 ml Öl/g Protein. Die Testbedingungen für die Emulgieraktivität sehen vor: 1) Herstellen der Proteindispersion/Lösung, 2) Mischung aus pflanzlichem Öl und dieser Lösung im verhältnis 1:1, 3) Rühren und Emulgieren der Mischung mit Laborrührer und 4) Zentrifugieren der Mischung/Emulsion (3000xg und 5 min.) und Bewerten des Volumens an Emulsionsphase in Prozent (=Emulgieraktivität). Handelsübliches Milcheiweiß (Na-Caseinat) besitzt unter vergleichbaren Testbedingungen eine Emulgieraktivität von 90 %.

35 Bei erfindungsgemäßen Proteinpräparaten mit einem Feststoffgehalt von 8 bis 20% kann man bei pH 7 und nach 30-

minütiger Wärmebehandlung bei 90 °C und 3-stündiger Lagerung bei 3 °C die Fähigkeit zur Bildung von Gelen mit meßbarer Festigkeit beobachten. Hierfür wurde als Meßgerät Stable Mirco Systems, TAX-T2, Surrey, GB verwendet.

5

Bei pH 7 lag die Schaumaktivität der erfindungsgemäßen Proteinpräparate bei mindestens 600% und vorzugsweise bei über 1000% bei einer Schaumdichte von 190 bis 250 g/l. Zum Vergleich: Das unbehandelte Ausgangsmaterial besaß eine Schaumaktivität von 900 bis 1200% und eine Schaumdichte von 150 bis 200 g/l. Als Aufschlagmaschine wurde eine Hobart 50-N verwendet. Hühnereiweißpulver (Eiklar) mit 12,6 % Trpckensubstanzanteil in Lösung besitzt unter den gleichen Testbedingungen nach 4 Minuten eine Schaumaktivität von 1500. % und eine Schaumdichte von 70g/l.

15

Das erfindungsgemäße Proteinpräparat kann entweder als solches oder aber als Lebensmittelzutat eingesetzt werden. Möglichkeiten hierfür sind oben aufgelistet. Die Verwendung in Speiseeis und die vorteilhaften Eigenschaften, die damit erzielt werden, sind in Beispiel 7 angegeben.

20

Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

25 Beispiel 1

Rohstoffvorbereitung

30

Lupinensaat wurde geschält und flockiert und anschließend gemäß EP 1 024 706 B1 entölt und entbittert. Bei einem pH-Wert, der in etwa dem isoelektrischen Punkt entspricht, wurden antinutritive Substanzen wie lösliche Kohlenhydrate abgetrennt. Das Protein des vorbehandelten Materials wurde extrahiert, indem es einem alkalischen Medium (pH 7-9) von 35 °C bis 45 °C ausgesetzt wurde, wobei eine Fraktionierung zwischen Raffinat und Proteinextrakten erfolgte. Aus dem Proteinextrakt wurde im sauren Medium (pH 4,5) eine Proteinfällung durchgeführt. Der resultierende "Proteinquark" wurde thermisch behandelt und einer

35

Sprühtrocknung unterworfen. Das so erhaltene Proteinisolat besaß die folgende Zusammensetzung (Gew.-%):

Wasser 5-7

Trockenmasse 92-93

5 Rohproteingehalt (i.Tr.) >90%

Fettgehalt (i.Tr.) <2,5%

Kohlenhydrate (i.Tr.) <1%.

Beispiel 2

10 Fermentation mit *Lactobacillus perolens anaerob*

Das Proteinisolat aus Beispiel 1 wurde mit Hefeextrakt, Mineralsalz und Citronensäure gemischt (Zusammensetzung: 15% Proteinisolat, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% Mineralsalze, 0,2% Citronensäure) und in zuvor sterilisiertem Wasser, das bereits im Fermenter vorgelegt wurde, dispergiert. Anschließend erfolgte eine Tyndallisierung des Fermentationsmediums:

1. Pasteurisation bei 72 °C für 10 min
2. Bebrütung des Mediums für 24h bei 30 °C
- 20 3. Pasteurisation bei 82 °C für 10 min

Nach Ende des 2. Pasteurisationsschritts erfolgte die Zugabe von D(+)-Glucose-Monohydrat in einer Menge von 2 Gew.-%, was bis zu diesem Zeitpunkt aufgeschoben wurde, um Bräunungsreaktionen im Fermenter zu verhindern. Anschließend wurde der Fermenter mit dem Inokulum des Mikroorganismus (1% Bakteriensuspension bezogen auf den Fermenterinhalt) beimpft. Man ließ die Mischung 48 Stunden lang bei 27 °C anaerob fermentieren.

30 Als online-Messgrößen wurden erfasst: pH-Wert, Temperatur, Drehzahl des Fermenters, Gelöstsauerstoff. Als analytische Messgrößen wurden die Keimzahl, die Menge an Diacetyl als Aromaleitsubstanz und die Milchsäurekonzentration erfasst.

Nach 48h wurde die Fermentation durch eine 10-minütige
35 Pasteurisation des Mediums bei 72 °C beendet.

Gehalt des Fermentationsmediums nach 48 h Fermentation:

L+Milchsäure 17,5 g/l; pH 4.1
Diacetyl 11,5 ppm

Das Beispiel wurde mit geänderten Mengen an Citronensäure
5 (0g/5g) wiederholt, wobei festgestellt wurde, dass die
Entstehung von Diacetyl linear mit der Menge an Citronensäure
korreliert und den Fermentationsverlauf nicht negativ
beeinflusst. Wurde keine Citronensäure zugesetzt, konnte im
10 Endprodukt eine etwa um den Faktor 1,5-2 geringere
Diacetylkonzentration nachgewiesen werden.

Beispiel 3

Fermentation mit *Lactobacillus perolens* aerob

15 Beispiel 2 wurde wiederholt, mit der Maßgabe, dass bei im
übrigen unveränderten Bedingungen die Fermentation unter aeroben
Bedingungen mit 15% Sauerstoffsättigung geführt wurde:
Gehalt des Fermentationsmediums nach 48 h Fermentation:
L + Milchsäure 17,5 g/l; pH 4.2
20 Diacetyl 21,9 ppm

Beispiel 4

Fermentation mit *Lactobacillus paracasei* anaerob

25 Die Fermentation wurde mit dem unter Beispiel 2 angeführten
Fermentationsmedium und Fermentationsbedingungen, jedoch unter
Verwendung von *Lb. paracasei* durchgeführt.

Milchsäure- und Diacetylgehalt nach 48 h Fermentation:

30 L + Milchsäure 13,9 g/l, pH 4.0
Diacetyl 2-3,8 ppm

Beispiel 5

Fermentation mit *Lactobacillus paracasei* aerob

35

Beispiel 4 wurde wiederholt, mit der Maßgabe einer aeroben
Prozessführung, wie unter Beispiel 3 beschrieben. Nach 48 h
Fermentation wurden folgende Gehalte gemessen:

L + Milchsäure 14,5 g/l, pH 4.0
Diacetyl 6,98 ppm

Beispiel 6

5 Herstellung von Speiseeis

Für die Eisherstellung wurden Proteinpräparate gemäß den Beispielen 2 bis 5 in sprühgetrockneter Form neben einem Standardpräparat (milcheiweißhaltig) und einem nicht fermentierten Präparat pflanzlichen Ursprungs eingesetzt.
10 Verschiedene Eiscremerezepturen wurden untersucht.

Ein industrielles Verfahren zur Speiseeisbereitung wurde herangezogen und entsprechend auf den Labormaßstab
15 zugeschnitten.

Die Zubereitung des Eismix erfolgt in einem beheizbaren Laborreaktor (IKA), welcher mit einem Mischer versehen ist. Um eine homogene Struktur zu erhalten, wird ein Rotor-Stator-System
20 (Ultra-Turrax) verwendet. Im ersten Schritt wird das Wasser im IKA-Reaktor vorgelegt und auf 95 °C erhitzt. Die pulverförmigen Rezepturbestandteile werden abgewogen, gemischt und unter laufendem Rührwerk (ca. 100 U/min) sowie Homogenisator (IKA 8500 U/min) zudosiert. Daraufhin wird das Öl spontan zugegeben.
25 Während des gesamten Vorgangs wird die Temperatur kontrolliert. Wenn der Mix eine Temperatur von 75 °C erreicht hat, wird für 2 Minuten weiter pasteurisiert. Anschließend wird vom Heizkreislauf auf den Kühlkreislauf umgeschaltet und der Mix wird unter laufendem Rührwerk und Homogenisator bis auf 15 °C
30 abgekühlt. Der fertige Eismix wird abgefüllt und für 254 h bei 5°C reifen gelassen, damit die Aromakomponenten ihre Wirkung entfalten können. Mit einer Eismaschine mit Kälteakku und Rührwerk wird der Eismix ausgefroren und bei -20 °C für 24 h in einem Kühlraum gehärtet. Nach Ablauf dieser Zeit werden die
35 Textur, das Abschmelzverhalten und die sensorischen Eigenschaften des Speiseeises charakterisiert.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Anteil an substituierten Milchproteinen variiert. Dabei wurden 0%, 25%, 50% und 100% der Milchproteine durch das Proteinpräparat gemäß Beispiel 2 substituiert. Die verwendeten Ausgangsmaterialien sind aus
5 Tabelle 1 zu ersehen.

Tabelle 1: Rezepturen für Typ Eiscremeprodukte mit Pflanzenfett und Substitutionsprodukte:

		Milch eis	Eiscreme auf pflanzlicher Basis			
Zusammensetzung Nr.		V	1	2	3	4
Substitutionsanteil Milchprotein		Refer enz	10 %	25 %	50 %	100 %
Wasser	ml	320	320	320	320	320
Zucker	g	62	56,5	60	60	62
Glucosesirup trocken	g	23	17,5	17,5	20	23
Maltodextrin	g	--	--	--	5,5	15
Pflanzenfett	g	40	40	40	40	40
Magermilchpulver	g	28	39,5	34	22	--
Molkenpulver	g	23,5	--	--	--	--
Proteinpräparat Bsp. 2	g	--	1,5	3,5	7,5	15
Stabilisator (Carragen)	g	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Vanillinzucker	g	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
Summe Bestandteile	g	508,5	487,0	487,0	487,0	487,0

5

In einer zweiten Versuchsreihe wurden vier Eiscremes mit den fermentierten Trockenprodukten der einzelnen Beispiele 2 bis 5 hergestellt, wobei in den Eiscremerezepaturen jeweils 50 % der Milchproteine durch das erfindungsgemäße Proteinpräparat substituiert wurden.

10

Insgesamt wurden acht Eiscremes auf ihr sensorisches Verhalten hin geprüft, von denen ein Produkt zum Vergleich ohne pflanzliche Proteine und ein Produkt mit einem nativen, nicht fermentierten Lupinenproteinisolat gemäß Beispiel 1 erzeugt wurden. Vier Eiscremes stammten aus der oben erwähnten zweiten Versuchsreihe, in der jeweils 50 % der Milchproteine durch Proteinpräparate der Beispiele 2 bis 5 ersetzt waren. Die restlichen beiden Eiscremes wurden mit den Zusammensetzungen 2 und 4 gemäß Tabelle 1 unter Verwendung des Trockenprodukts gemäß Beispiel 2 hergestellt.

15

20

Charakterisierung der Eiscreme-Eigenschaften

(A) Sensorische Merkmale

5 Tabelle 2 zeigt die sensorischen Merkmale der erzeugten Eiscremes.

Die erzeugten Eiscremes wurden hinsichtlich Form, Aussehen, Farbe, Geruch, Geschmack und Konsistenz/Mundgefühl bewertet.

10

Die Eiscreme 01 (ohne pflanzliche Proteine) erscheint auf dem Löffel gebrochen, kantig und in der Farbe gräulich-weißlich. Das Eis 02 (mit Proteinisolat) ist in der Form auf dem Löffel gebrochen, aber nicht so kantig. Die Farbe ist gelblich bis
15 bräunlich. Eiscremes 03 bis 08 sind in der Form gebrochen, allerdings ist die Farbe gelblich bis weißlich.

Die Eiscremes 01 und 02 unterscheiden sich im Geruch nur gering. Beide Produkte riechen mild, nach Vanille und leicht süßlich.

20 Der Geruch des erfindungsgemäßen Proteinpräparats gibt den Eiscremes 03-08 eine aromatische, säuerliche und joghurtartige Note.

Die Eiscremes 01 und 02 unterscheiden sich im Geschmack dahingehend voneinander, dass der Zusatz von 50 % Lupinenprotein gemäß Beispiel 1 dem milchartigen Geschmack eine zusätzliche nussige Note verleiht. Innerhalb der Eiscremeprodukte, die mit dem erfindungsgemäßen Proteinpräparat hergestellt wurden, wurde im Rahmen der Prüfung von allen Prüfern das Eis 03 als besonders
30 gut schmeckende Eiscreme bewertet. Es wurden die Merkmale milchartig, joghurtartig, Vanille, leicht säuerlich festgestellt. Aber auch alle anderen Eiscremeprodukte (03 bis 08) zeigten dieses milchartige Geschmacksprofil und eine gute Cremigkeit.

35

Durch den Einsatz des erfindungsgemäßen proteinhaltigen Präparats können, wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, Eiscremes mit "Einfacheiscreme"-Rezepturen hergestellt werden, die aber in der Konsistenz höherwertigen Rezepturen gleichwertig sind. Die Konsistenzmerkmale der Eiscremes 03 bis 08 werden üblicherweise den Eissorten Cremeeis, Eiercremeeis oder Rahmeis zugeschrieben.

Tabelle 2: Sensorik der Merkmale der Eiscremeprodukte.

Eis	Pflanzen- protein- präparat	Form Aussehen Farbe	Geruch	Geschmack	Konsistenz/ Mundgefühl
01	0 %	Gebrochen, kantig, grünlich, weißlich	mild, Vanille, süßlich	Milchartig, süß, Vanil- le, mehli- ger Nachge- schmack	fettig, klebrig, leimig
02	50 % unfermen- tiert	gebrochen, gelblich, bräunlich	mild süßlich, Vanille	Milchartig, malzig, mehlig, nussig, heuig süßlich	weniger kalt als 01, cremig, fein, locker
03	50 % Präparat gemäß Beispiel 2	wie 02 gelblich, weißlich	Aroma- tisch, säuer- lich, Vanille, joghurt- artig	Milchartig, joghurt- artig, Vanille, säuerlich	weniger kalt als 01, sahnig, cremig, fein, locker
04	50 % Präparat gemäß Beispiel 4	wie 03	wie 03 aber weniger säuer- lich	wie 03	wie 03
05	50 % Präparat gemäß Beispiel 3	wie 03	wie 03 süßlich	wie 03	wie 03
06	50 % Präparat gemäß Beispiel 4	wie 03	wie 03, süßlich	wie 03	wie 03
07	25 % Präparat gemäß Beispiel 2	wie 03	weniger intensiv als 03	weniger intensiv als 03	wie 03
08	100 % Präparat gemäß Beispiel 2	wie 03	wie 03, aber inten- siver	wie 03	wie 03, aber fester, zäher

(B) Texturmerkmale

Die folgende Tabelle 3 zeigt die Festigkeit und das Abschmelzverhalten der untersuchten Eiscremes.

5
Tabelle 3: Technologische Eigenschaften der Eiscremeprodukte

Eis	Eingesetzte Proteine	Substitutionsanteil [%]	Textur [N/m ²]	Abschmelzzeit [g/min]
01	Milchproteine	0	2,04	0,44
02	Unfermentiertes Pflanzenprotein	50	3,84	0,33
03	Protein Beispiel 2	50	4,74	0,31
04	Protein Beispiel 4	50	4,70	0,33
05	Protein Beispiel 3	50	4,94	0,33
06	Protein Beispiel 5	50	4,83	0,35
07	Protein Beispiel 2	25	3,78	0,37
08	Protein Beispiel 2	100	4,93	0,32

Von der rheologischen Betrachtungsweise ausgehend, ergab sich durch die Substitution der Milchproteine durch pflanzliche proteinhaltige Präparate eine verbesserte Cremigkeit, Konsistenz und ein angenehmeres Mundgefühl. Dies drückt sich aus in einer höheren Festigkeit der Eiscremeprodukte mit diesen Proteinpräparaten, die auf ein verbessertes Gefüge und auf eine verbesserte Struktur und Verteilung der Bestandteile hindeutet. Ein signifikanter Einfluss auf das Abschmelzverhalten lässt sich ebenfalls erkennen. Die Abschmelzrate der Eisprodukte nimmt mit zunehmendem Anteil an Lupinenprotein deutlich ab (vgl. Tab. 3).

Bei der Variation der Konzentration an erfindungsgemäßem Protein zeigte sich insbesondere, dass mit zunehmendem Anteil an pflanzlichem Protein die Cremigkeit und Konsistenz des Eisproduktes verbessert wird. Beim Produkt mit 100 %-iger Substitution des Milcheiweiß resultierte dies in einer relativ festen Struktur, die aber nicht als unangenehm bezeichnet wurde.

Wie in den vorherigen Punkten bereits ausgeführt, lässt sich die Struktur der Eiscremeprodukte durch den Zusatz von pflanzlichen Proteinen eindeutig verbessern. Aufgrund des in der Regel leguminosenartigen Geschmacks sind solche Produkte jedoch von geringerem Interesse. Erst durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Proteinpräparate lassen sich Produkte erhalten, die ein milchartiges Aromaprofil aufweisen. In allen Tests zeigte sich, dass das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteinpräparate hergestellte Eis nahezu oder vollständig frei von leguminosenartigem Geschmack war. Insbesondere die mit *Lactobacillus perolens* fermentieren Produkte zeigten ein völlig reines Aromaprofil, vergleichbar mit dem reiner Milchprodukte.

* * *

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25. Okt. 2002

Ansprüche:

1. Proteinpräparat, gekennzeichnet durch
 - mindestens 60% Protein pflanzlichen Ursprungs, bezogen auf das Trockengewicht,
 - ein milchartiges Aroma, das einer Menge von mindestens 1 ppm Diacetyl entspricht, und
 - einem Gehalt an Milchsäure.
2. Proteinpräparat nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch
 - mindestens 70% Protein pflanzlichen Ursprungs, bezogen auf das Trockengewicht,
 - ein milchartiges Aroma, das einer Menge von mindestens 7 ppm Diacetyl entspricht, und
 - einem Gehalt von mindestens 0,5 Gew.-% Milchsäure.
3. Proteinpräparat nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch
 - mindestens 85% Protein pflanzlichen Ursprungs, bezogen auf das Trockengewicht,
 - ein milchartiges Aroma, das einer Menge von mindestens 15 ppm Diacetyl entspricht, und
 - einem Gehalt von mindestens 1,0 Gew.-% Milchsäure.
4. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei der Milchsäure vorwiegend oder ausschließlich um L-Milchsäure handelt.
5. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass es lactosefrei und cholesterinfrei ist.
6. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass es probiotische Milchsäurebakterien enthält.

7. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es unter Verwendung von Leguminosen, insbesondere von Lupinen, Soja und Erbsen, und ganz besonders bevorzugt von Lupinensamen hergestellt ist.
- 5 8. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass es in 10 %iger Lösung bei pH 7 eine Emulgieraktivität von 40 bis 50% besitzt und/oder dass es in 1 %iger Lösung mindestens 400 ml, bevorzugt mindestens 500 ml Öl/g Protein emulgieren kann.
- 10 9. Proteinpräparat nach einem der voranstehenden Ansprüche, gekennzeichnet dadurch, dass es bei einem pH-Wert von 7 über eine Schaumaktivität von mindestens 600%, vorzugsweise von über 950% und/oder eine Schaumdichte von 190 bis 250 g/l verfügt.
- 15 10. Verfahren zum Herstellen eines Proteinpräparats, gekennzeichnet dadurch, dass man ein in geeigneter Weise vorbehandeltes pflanzliches Ausgangsmaterial mit mindestens 60 Gew.-% Pflanzenprotein, bezogen auf das Trockengewicht des Materials, mit einem Milchsäure produzierenden
20 Mikroorganismus in Gegenwart einer oder mehrerer für den Mikroorganismus notwendigen Nährstoff-, Stickstoff- und/oder Mineralstoffquelle(n) in an sich bekannter Weise fermentiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, dass der Mikroorganismus ausgewählt ist unter vorzugsweise
25 homofermentativen und potentiell heterofermentativen Mikroorganismen, ausgewählt unter Lactococcen, Lactobacillen und Pediococcen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, gekennzeichnet dadurch, dass der Mikroorganismus ausgewählt ist unter *Lactobacillus perolens*,
30 *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus plantarum*.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, gekennzeichnet
dadurch, dass die Fermentation mit einer Lösung oder
Dispersion des Pflanzenproteins in einer Konzentration von 5-
25 % Trockenmasse, vorzugsweise 15 bis 20 % Trockenmasse,
5 durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch
gekennzeichnet, dass die Fermentation in einem Medium
erfolgt, dem Citronensäure in einer Menge von 0,1 bis 2,5
g/l, vorzugsweise von etwa 2 g/l, beigegeben wurde.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, gekennzeichnet
dadurch, dass die Fermentation in Gegenwart eines Puffers
erfolgt, der das Absinken des pH-Wertes durch das Entstehen
der Milchsäure abpuffert.
16. Proteinpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das
15 milchartige Aroma erhalten wurde durch die biotechnologische
Behandlung eines vorwiegend oder ausschließlich pflanzlichen
Ausgangsmaterials.
17. Proteinpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, erhalten
durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15.
- 20 18. Verwendung eines Proteinpräparats nach einem der Ansprüche 1
bis 9, 17 und 18 als Lebensmittelzutat.
19. Verwendung eines Proteinpräparats nach Anspruch 6 als
probiotisches Lebensmittel.
- 25 20. Verwendung eines Proteinpräparats nach Anspruch 18 zur
Herstellung von Speiseeis.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25. Okt. 2002

**Biotechnologisch erzeugbares proteinhaltiges Präparat, Verfahren
zu seiner Herstellung und seine Verwendung als Lebensmittelzutat**

5 Die Erfindung betrifft ein proteinhaltiges Präparat pflanzlichen
Ursprungs mit deutlich verbesserten sensorischen und ggf. auch
ernährungsphysiologischen sowie unvermindert guten
technofunktionellen Eigenschaften, das durch Fermentation mit
einem Milchsäurebakterium gewonnen werden kann. Dieses Präparat
10 eignet sich als vielseitig verwendbare Lebensmittelzutat. Es
enthält mindestens 60% Protein pflanzlichen Ursprungs, bezogen
auf das Trockengewicht, ein milchartiges Aroma, das einer Menge
von mindestens 1 ppm Diacetyl entspricht, und Milchsäure. Des
weiteren beschreibt die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen
15 eines solchen Proteinpräparats, wobei ein pflanzliches
Ausgangsmaterial mit mindestens 60 Gew.-% Pflanzenprotein,
bezogen auf das Trockengewicht des Materials, mit einem
Milchsäure produzierenden Mikroorganismus in Gegenwart einer
oder mehrerer für den Mikroorganismus notwendigen Nährstoff-,
20 Stickstoff- und/oder Mineralstoffquelle(n) in an sich bekannter
Weise fermentiert wird.

* * *

PCT Application

EP0311264



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.